

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

21

(11)Publication number : 03-109400

(43)Date of publication of application : 09.05.1991

(51)Int.Cl.

C07K 15/22

C07K 3/20

C12N 9/08

(21)Application number : 01-247326

(71)Applicant : SNOW BRAND MILK PROD CO LTD

(22)Date of filing : 22.09.1989

(72)Inventor : SATO KAORU  
DOSEMARI SHUNICHI

(54) METHOD FOR SEPARATING, PURIFYING AND COLLECTING IRON BINDING PROTEIN

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain lactoperoxidase and lactoferin for medicine in high purity and yield by bringing iron binding protein-containing solution into contact with sulfone group-introducing polysaccharides affinity carrier and successively treating the solution with an aqueous solution different in ion strength.

CONSTITUTION: A solution containing iron binding protein is brought into contact with polysaccharides affinity carrier in which a sulfone group is introduced to absorb an iron binding protein and the carrier is cleaned with an aqueous solution or buffer having  $\leq 0.2$  ion strength and  $\text{pH} \leq 5$  and lactoperoxidase absorbed into the carrier is eluted with an aqueous solution or buffer having  $\geq 0.5$  ion strength and  $\text{pH} \geq 5$  to separate and purify lactoperoxidase and/or lactoferin of iron binding protein from iron binding protein-containing solution.

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 特 許 公 報 (B 2)

(11) 特許番号

第2686831号

(45) 発行日 平成 9 年 (1997) 12 月 8 日

(24) 登録日 平成 9 年 (1997) 8 月 22 日

(51) Int.Cl.<sup>9</sup>

C 0 7 K 14/79

1/22

識別記号

庁内整理番号

F I

C 0 7 K 14/79

1/22

技術表示箇所

請求項の数 5 (全 5 頁)

(21) 出願番号 特願平 1 - 247326

(22) 出願日 平成 1 年 (1989) 9 月 22 日

(65) 公開番号 特開平 3 - 109400

(43) 公開日 平成 3 年 (1991) 5 月 9 日

(73) 特許権者 999999999

雪印乳業株式会社

北海道札幌市東区苗穂町 6 丁目 1 番 1 号

(72) 発明者 佐藤 薫

埼玉県川越市新宿町 5 - 11 - 3 雪印独  
身寮

(72) 発明者 堂迫 俊一

埼玉県浦和市北浦和 5 丁目 15 番 39 - 616  
号

(74) 代理人 弁理士 藤野 清也

審査官 今村 玲英子

(54) 【発明の名称】 鉄結合性蛋白質を分離、精製し、採取する方法

1

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 スルホン基を導入した多糖類アフィニティ担体を用いて、鉄結合性蛋白質を含有する溶液からラクトパーオキシダーゼ及び／又はラクトフェリンを分離、精製し、これを採取するに際して、

(a) 鉄結合性蛋白質を含有する溶液をスルホン基を導入した多糖類アフィニティ担体と接触させて鉄結合性蛋白質を吸着させ、

(b) イオン強度 0.2 以下で pH5 以下の水溶液又は緩衝液で該担体を洗浄し、

(c) イオン強度 0.2 ~ 0.7 で pH5 以下の水溶液又は緩衝液で該担体に吸着されたラクトパーオキシダーゼを溶出し、

(d) 次に、イオン強度 0.5 以上で、pH5 以上の水溶液又は緩衝液で該担体に吸着されたラクトフェリンを溶出

2

する、

以上の (a) ~ (d) の処理を順次行うか、あるいは

(a)、(b) の処理を行った後 (c) 又は (d) の処理を行うことを特徴とする鉄結合性蛋白質含有溶液から鉄結合性蛋白質のラクトパーオキシダーゼ及び／又はラクトフェリンを分離し、精製し、これを採取する方法。

【請求項 2】 スルホン基を導入した多糖類アフィニティ担体を用いて、鉄結合性蛋白質を含有する溶液からラクトパーオキシダーゼ及び／又はラクトフェリンを分離、精製し、これを採取するに際して、

(a) 鉄結合性蛋白質を含有する溶液をスルホン基を導入した多糖類アフィニティ担体と接触させて鉄結合性蛋白質を吸着させ、

(b) イオン強度 0.1 以下で pH5 以上の水溶液又は緩衝液で該担体を洗浄し、

10

(c) さらに、イオン強度0.2以下でpH5以下の水溶性又は緩衝液で該担体を洗浄し、

(d) イオン強度0.2～0.7でpH5以下の水溶液又は緩衝液で該担体に吸着されたラクトパーオキシダーゼを溶出し、

(e) 次いで、イオン強度0.5以上でpH5以上の水溶液又は緩衝液で該担体に吸着されたラクトフェリンを溶出する、

以上の(a)～(e)の処理を順次行うか、あるいは

(a)～(c)の処理を順次行った後(d)又は(e)の処理を行うことを特徴とする鉄結合性蛋白質含有溶液から鉄結合性蛋白質のラクトパーオキシダーゼ及び／又はラクトフェリンを分離し、精製し、これを採取する方法。

【請求項3】スルホン基を導入した多糖類アフィニティ担体が担体1ml当たり10～15μeqのスルホン基を導入した多糖類アフィニティ担体である請求項(1)又は(2)に記載の鉄結合性蛋白質のラクトパーオキシダーゼ及び／又はラクトフェリンを分離、精製し、これを採取する方法。

【請求項4】スルホン基を導入した多糖類アフィニティ担体がキトサンである請求項(1)～(3)のいずれかに記載の鉄結合性蛋白質のラクトパーオキシダーゼ及び／又はラクトフェリンを分離、精製し、これを採取する方法。

【請求項5】鉄結合性蛋白質を含有する溶液が、脱脂乳またはホエーである請求項(1)～(4)のいずれかに記載の鉄結合性蛋白質のラクトパーオキシダーゼ及び／又はラクトフェリンを分離、精製し、これを採取する方法。

#### 【発明の詳細な説明】

##### 産業上の利用分野

本発明は、多様な生理活性を有し、薬理的にも重要な鉄結合性蛋白質であるラクトパーオキシダーゼ及び／又はラクトフェリンを鉄結合性蛋白質を含有する溶液から分離、精製し、これを採取する方法に関する。

##### 従来の技術

ラクトパーオキシダーゼ及びラクトフェリンは乳など外分泌液中に存在する鉄結合性蛋白質であり、共に殺菌効果を有することが知られている。このうち、ラクトパーオキシダーゼは蛋白質のヨードラベルに不可欠な物質であり、又、ラクトフェリンはリンパ球増殖効果、鉄吸収促進効果、白血球分化調整効果、過酸化脂質生成防止効果、抗ウイルス効果などの種々の生理機能を有する。このため、ラクトパーオキシダーゼ及びラクトフェリンは医薬品として利用が考えられる他、飼料や食品素材としても重要である。

従来、ラクトパーオキシダーゼ及びラクトフェリンを乳から分離する試みがなされていた。しかし、ラクトパーオキシダーゼ及びラクトフェリンは鉄結合性蛋白質で

あり、分子量及び等電点も類似しているため、この両者を一度の処理で効率よく分離することは困難であった。例えば、アルギネートゲルに乳を接触させてラクトパーオキシダーゼ及びラクトフェリンを同時に分離する方法(特開昭61-246198)では、ラクトパーオキシダーゼとラクトフェリンを同一画分中に得ることができるものの、ラクトパーオキシダーゼとラクトフェリンを分離するには、さらに精製工程を必要としている。また、カルボキシル基又はスルホン基を導入したデキストランで被覆したシリカ粒子を用い、塩濃度勾配によってラクトパーオキシダーゼとラクトフェリンを系統的に溶出する方法(特開平1-86839)も提案されているが、ラクトパーオキシダーゼとラクトフェリンを完全に分離するには、再度クロマトグラフ処理を必要としている。

一方、スルホン基を導入した多糖類アフィニティ担体に乳を接触させ、0.3M食塩を含むpH5～9の水溶液又は緩衝液で担体を洗浄した後、1.0M食塩水でラクトフェリンを溶出する方法(特開昭63-255300)では、ラクトフェリンを一度のクロマトグラフ処理で得ることができるものの、ラクトフェリンの純度及び回収率が若干低いという問題点がある。

発明が解決しようとする課題

本発明は、叙上の状況に鑑みなされたものであって、鉄結合性蛋白質を含有する溶液からラクトパーオキシダーゼ及び／又はラクトフェリンを一度のクロマトグラフ処理によって、効率的、かつ工業的規模で分離、精製し、これを採取するための方法を提供することにある。課題を解決するための手段

すなわち、本発明は

(a) 鉄結合性蛋白質を含有する溶液をスルホン基を導入した多糖類アフィニティ担体と接触させて鉄結合性蛋白質を吸着させ、

(b) イオン強度0.2以下でpH5以下の水溶液又は緩衝液で該担体を洗浄し、

(c) イオン強度0.2～0.7でpH5以下の水溶液又は緩衝液で該担体に吸着されたラクトパーオキシダーゼを溶出し、

(d) 次いで、イオン強度0.5以上でpH5以上の水溶液又は緩衝液で該担体に吸着されたラクトフェリンを溶出し、

(e) これらのラクトパーオキシダーゼ及び／又はラクトフェリンを採取することよりなる、鉄結合性蛋白質含有溶液から鉄結合性蛋白質のラクトパーオキシダーゼ及び／又はラクトフェリンを分離、精製し、採取する方法に関する。

本発明では、上記(a)処理と(b)処理との間に、イオン強度0.1以下でpH5以上の水溶液又は緩衝液で担体を洗浄する処理を行ってもよい。又、(c)のラクトパーオキシダーゼ溶出処理と(d)のラクトフェリン溶出処理とは、前記した(c)(d)の順で処理するほか、

(c) 処理又は (d) 処理を行ってラクトフェリン又はラクトパーオキシダーゼを溶出し、これを採取してもよい。

本発明では、まずラクトパーオキシダーゼとラクトフェリンにのみ特異的親和性を有するアフェニティ担体を用いて、実質的にラクトパーオキシダーゼ及びラクトフェリン以外の蛋白質を除去し、ラクトパーオキシダーゼとラクトフェリンとを吸着させ、そのクロマトグラフ処理で分離できるようにする。

このようなラクトラクトパーオキシダーゼ及びラクトフェリンのみに特異的親和性を有するアフェニティ担体として、ヘパリンセファロース（ファルマシア社製）やブルーセファロース（ファルマシア社製）などあるいはスルホン基をセルロースに導入したスルホン化セルロファイン（チッソ社製）やスルホン基をキトサンに導入したスルホン基キトパール（富士紡績社製）などの多糖類アフィニティ担体が市販されている。しかし、ヘパリンセファロース、ブルーセファロースなどは、高流速に耐えられず、高価であって、工業的規模で用いることができない。一方、スルホン化セルロファイン、スルホン化キトパールなどは、高流速に耐え、工業的規模での使用に適している。

本発明者らは、ラクトパーオキシダーゼ及びラクトフェリン以外の蛋白質の吸着をできるだけ抑制し、かつラクトパーオキシダーゼ及びラクトフェリンの吸着をできるだけ向上させるために、これらの多糖類アフェニティ担体に導入するスルホン基の量が重要であることを見出した。

担体に導入するスルホン基の量は、担体1ml当り10～50  $\mu$ eq、好ましくは担体1ml当り27～40  $\mu$ eqに調整する必要がある。スルホン基導入量が10  $\mu$ eq以下の場合、ラクトパーオキシダーゼ及びラクトフェリンの吸着量が少なく、従って、回収率が低くなる。スルホン基導入量が50  $\mu$ eq以上の場合、ラクトパーオキシダーゼ及びラクトフェリン以外の蛋白質が吸着され、純度が低くなる。スルホン基を導入する担体としては、セルロファイン（チッソ社製）やキトパール（富士紡績社製）などがあるが、回収されるラクトパーオキシダーゼ及びラクトフェリンの量は、スルホン化キトパールを用いた場合が最も多い。

本発明における担体に導入するスルホン基の上記の量は、次の方法で測定したものである。担体5mlをカラム（Bio-rad社製、エコノカラム10×100mm）に充填し、I  $\text{NHNO}_3$  100mlを流速250ml/hrで流す。次に、イオン交換樹脂で精製した純水を流速250ml/hrでメチルレッドで中性を示すまで流して洗浄する。これに、1mol  $\text{NaCl}$ を流速250ml/hrで適量流し、最初の50mlの流出液を分取し、よく混合し、10mlずつ3ケの三角フラスコに秤量し、0.01N  $\text{NaOH}$ でフェノールフタレインを指示薬として滴定してその平均値から求められる値である。

この際、イオン交換樹脂で精製した純水に代えて蒸留した超純水を用いて洗浄すると上記の値は、多少変動する。すなわち、10～50  $\mu$ eqが10～80  $\mu$ eqを示すこととなる。従って、このような測定法によるときは、担体に導入するスルホン基の量は、担体1ml当り10～80  $\mu$ eq、好ましくは、担体1ml当り30～60  $\mu$ eqに調整する必要がある。

次に、イオン強度及びpHを調整した溶出溶液を用いてラクトパーオキシダーゼとラクトフェリンを分離する。ラクトパーオキシダーゼとラクトフェリンは分子量及び等電点が類似しているのも、通常行われているようなイオン強度の差のみでラクトパーオキシダーゼとラクトフェリンを分離することは不可能である。

まず、イオン強度0.2以下でpH5以下の水溶液または緩衝液で該担体を洗浄し、担体の間に詰まっている不純物を除去する。この際、イオン強度0.2及びpH5を越えると担体に吸着しているラクトパーオキシダーゼが溶出してくるおそれがあるので、イオン強度0.05～0.15でpH2.5～4.5で洗浄を行うことが好ましい。

この洗浄処理に先立ってラクトパーオキシダーゼ及びラクトフェリンを吸着した担体をイオン強度0.1以下でpH5以上の水溶液又は緩衝液で予備洗浄してもよい。この洗浄には、水又は温湯を用いてもよい。この予備洗浄を充分行っておくとその後の洗浄で使用するイオン強度0.2以下でpH5以下の水溶液又は緩衝液の液量を減少させ、節約することができるので、製造コストを考慮すると有利である。

これらの洗浄に用いる緩衝液は特に限定されるものではなく、イオン強度0.2以下でpH5以下の緩衝能があるものであれば何れの緩衝液でもよく、酢酸緩衝液、クエン酸緩衝液などの有機酸緩衝液或いはグリシン緩衝液、ジメチルグルタル酸緩衝液などを例示することができる。リン酸緩衝液も使用可能であるが、pH5以下では緩衝能が低下する。

次に、該担体に吸着しているラクトパーオキシダーゼとラクトフェリンとを分離して溶出させる。本発明では特定のイオン強度とpHをもつ洗浄液で洗浄を行い、さらに溶出液として特定のイオン強度とpHとを有する水溶液または緩衝液を用いるので一度のクロマトグラフ処理で両者を効率よく分離し、溶出することができる。

担体に吸着しているラクトパーオキシダーゼを溶出させるには、イオン強度0.2～0.7でpH5以下、好ましくは、イオン強度0.4～0.6でpH2.5～4.5の水溶液又は緩衝液を用いる。イオン強度が0.2以下ではラクトパーオキシダーゼが溶出しないか、溶出しても極めて少量である。イオン強度が0.7以上になるとpHが5以下であっても同時にラクトフェリンが溶出するためラクトパーオキシダーゼの純度が低下し、更には、ラクトフェリンの回収量も低下する。一方、pHが5以上になるとイオン強度が0.2以下でも少量のラクトフェリンが同時に溶出する

のでラクトパーオキシダーゼの純度が低下する。

ここで用いる緩衝液も特に限定されるものではなく、酢酸緩衝液、クエン酸緩衝液等の有機酸緩衝液或いはグリシン緩衝液、ジメチルグルタル酸緩衝液などを用いることができ、イオン強度を高めるために食塩などを添加すればよい。このようにして得られたラクトパーオキシダーゼの純度は50%以上であり、通常は純度80%以上のラクトパーオキシダーゼを容易に得ることができる。

また、一方担体に吸着しているラクトパーオキシダーゼを溶出した後、イオン強度0.5以上でpH5以上、好ましくはイオン強度0.7~2.0でpH6~8の水溶液または緩衝液でラクトフェリンの溶出を行う。イオン強度が0.5以下ではラクトフェリンの溶出量が少なく、又、pHが5以下でもラクトフェリンの溶出量が少ない。

ここで用いる水溶液又は緩衝液は特に限定されるものではなく、水に食塩を溶解してイオン強度を0.5以上に調整した水溶液やクエン酸緩衝液、酢酸緩衝液、マレイン酸緩衝液等の有機酸緩衝液或いはリン酸緩衝液、イミダゾール緩衝液、重炭酸ナトリウム緩衝液、ホウ酸緩衝液、トリス緩衝液などを例示することができる。このようにして得られたラクトフェリンの純度は70%以上であり、通常は80%以上のラクトフェリンを得ることができる。

これらのラクトパーオキシダーゼの溶出処理やラクトフェリンの溶出処理は、必要に応じてどちらか一方の処理を行ってもラクトパーオキシダーゼ又はラクトフェリンを高純度に得ることができる。

最後に、水又は温湯で洗浄し、再生することによって、再度、担体をラクトパーオキシダーゼ及びラクトフェリンの精製に用いることができるようになる。

これらの吸着及び溶出に用いる反応器は特に限定されるものではなく、充填層型、流動層型及び攪拌層などを用いることができるが、高い流速でもチャネリングを起こさず、かつ圧密も生じさせない反応器として、回転型カラムが好ましい。

原料となる鉄結合性蛋白質を含有する溶液として、脱脂乳やホエーを例示することができる。加熱殺菌されたものであってもよいが、加熱されることによって、ラクトパーオキシダーゼが活性を失ったり、ラクトフェリンが変性するのみならず、他の蛋白質と相互作用して、純度が低下したり、回収率も低下するため好ましくは未加熱のものがよい。

上述のようにして得られたラクトパーオキシダーゼ又はラクトフェリンは、限外濾過や電気透析等の手段によって脱塩された後、通常の手法で乾燥され、医薬品、食品その他の用途に供される。

#### 発明の効果

本発明に従ってラクトパーオキシダーゼ又はラクトフェリンを分離採取すると、従来法にみられるように再度クロマトグラフ処理を行ってラクトパーオキシダーゼ又

はラクトフェリンを分離、精製する必要がなく、工程を簡略化することができる。すなわち、本発明によれば一回のクロマトグラフ処理によって、純度80%以上のラクトパーオキシダーゼ及びラクトフェリンを回収することができる。更に、限外濾過工程を付することによって、僅かに含まれる低分子の不純物を除去することができ、最終的には純度90%以上のラクトパーオキシダーゼ又はラクトフェリンを得ることができる。

このように工程が簡略化できること、純度が高いこと、又、回収率が高いことから、生産コストを安価にすることが可能となるばかりでなく感染予防用の食品や医薬品、貧血予防用の食品や医薬品或いは治療剤として利用することが可能である。

次に本発明の実施例を示す。

#### 実施例 1

スルホン基導入手量29.4  $\mu$  eq/ml・ゲルのスルホン化キトパール（富士紡績社製）1mlを1.0cm×4.0cmのカラムに充填し、100mlの未殺菌脱脂乳を240ml/hrの速度で通液した。この脱脂乳中にはラクトパーオキシダーゼ（LP）が3mg、ラクトフェリン（LF）が10mg含まれていた。通液後、100mlの脱イオン水で洗浄し、更に、0.1Mの食塩水を含み、希塩酸でpHを3.5に調整した水溶液50mlでゲルを洗浄した。次に0.4M食塩を含む0.01Mフタル酸緩衝液（pH4.5）100mlを通液しLPを回収した。更に、1.0M食塩を含む0.01Mりん酸緩衝液（pH7.6）100mlを通液し、LFを回収した。カラムには脱イオン水300mlを通液し、再生した。

このようにして、2.4mgのLP及び8.2mgのLFを回収した。得られたLP及びLFの純度はそれぞれ82および85%であった。

#### 実施例 2

スルホン基導入手量33  $\mu$  eq/ml・ゲルのスルホン化セルロファイン（チッソ社製）10mlを500mlのピーカーに入れ、未殺菌脱脂乳200mlと共に40分間室温にて攪拌した。脱脂乳をデカンテーションにより捨てた後、0.05Mの食塩を含む、0.005M酢酸緩衝液（pH6.0）でゲルを洗浄後、0.15M食塩を含む0.005M酢酸緩衝液（pH4.0）で更にゲルを洗浄した。緩衝液をデカンテーションによって捨てた後、0.5M食塩を含む0.005M酢酸緩衝液（pH4.0）50mlとゲルを10分間攪拌し、デカンテーションによって上澄液40mlを得、この上澄液からLPを得た。次いで、0.8M食塩を含み、希カセイソーダでpHを8.0に調整した水溶液50mlとゲルを10分間攪拌し、デカンテーションによって上澄液を得、この上澄液からLFを得た。最後に温湯（40℃）100mlでゲルを10分間攪拌した。この操作を5回繰り返してゲルを再生した。

このようにして、純度83%のLPを3.8mg、純度85%のLFを12.5mg回収した。

#### 実施例 3

スルホン基導入量 $38.9 \mu\text{eq}/\text{mg}$ ・ゲルのスルホン化キトパール（富士紡績社製）1.71を内容積2.31の回転型吸脱着装置に充填した。

未殺菌チーズホエーをクラリファイヤーに通し、混在していたカードを除去したもの100lを200 l/hrの流速で1時間循環した。このチーズホエー中にはLPが約4g、LFが約8g含まれていた。通液後40lの温湯を通液し、次いで0.1M食塩を含む0.005Mクエン酸緩衝液（pH4.0）20lで更にゲルを洗浄した。次に、0.5M食塩を含む0.005Mクエン酸緩衝液（pH4.0）20lを通液しLPを溶出した。この時のLP純度は85%であった。更に、1.0M食塩水に重炭酸ソーダを添加し、pHを6.8に調整した水溶液20lを通液しLFを溶出した。この時のLF純度は85%であった。最後に温湯（40℃）を60l通液しゲルを再生した。

得られたLP及びLF溶液は分子量cut-off50Kの限外濾過膜（日東電工NPU3150 S2）を備えた限外濾過装置（日東電工RUW-4）で限外濾過し、更に同装置を用いてダイアフィルトレーションして脱塩した。脱塩後、各々凍結乾燥し、LPを3.8g、LFを7.4g得た。最終的な純度はLP92%、LFも同じく92%であった。

#### 実施例 4

実施例3と同様にチーズホエー100lを循環通液し、温湯、続いて0.1M食塩を含む0.005Mクエン酸緩衝液でスルホン化キトパールを洗浄した後、炭酸カリウムでpHを7.5に調整し、食塩を0.8M含む水溶液20lを通液した。この溶出液を実施例3と同様に限外濾過して濃縮した後にダイアフィルトレーションし脱塩した。凍結乾燥物中にはLP3.5g、LF7.3gが含まれていた。